铁皮石斛 SPL 膜结合(STM)转录因子的全基因组鉴定及表达分析

杨乐，聂聪，龙小琴，何基泽，颜超越，朱乾坤，王万军*

(西南交通大学 生命科学与工程学院，成都 610031)

摘要：SPL 转录因子广泛参与植物生长发育、胁迫响应等过程。目前没有关于铁皮石斛 SPL 膜结合(SPL with Transmembrane Motif)转录因子,即 STM 转录因子的研究。为了探究 STM 转录因子在铁皮石斛生长发育及胁迫响应等方面的作用，该文在铁皮石斛全基因组水平鉴定出 4 个 STM 转录因子，并对 *DoSTM* 基因家族成员进行生物信息学分析，又利用逆转录 PCR 研究了 *DoSTM* 在不同组织部位及不同逆境处理下的表达情况。结果表明：(1)DoSTM1-4 为亲水蛋白，均具有 SBP 保守结构域和一些激素响应位点。(2)四个 *DoSTM* 在根茎叶中均有表达，*DoSTM*2 在叶中的相对表达量最低；*DoSTM*1/3/4 的相对表达水平均无明显差异。(3)*DoSTM*1-4 在低温、高温、干旱胁迫下的相对表达水平都有显著变化，*DoSTM*1/3/4 的表达量降低最为明显，故推测 DoSTM 与植物体内激素响应，温度变化响应及抗旱性有关。这些结论为后续进一步开展对铁皮石斛 STM 转录因子的研究奠定了基础。

关键词：铁皮石斛，STM 转录因子，基因鉴定，功能分析，基因表达

中图分类号：Q943 **文献标识码：**A

Genome wide identification and expression analysis of SPL with transmembrane motif (STM) transcription factor in *Dendrobium officinale*

YANG Le, NIE Cong, LONG Xiaoqin, HE Jize, YAN Chaoyue, ZHU Qiankun, WANG Wanjun*

(*School of Life Science and Engineering*, *Southwest Jiaotong University*, Chengdu 610031, China)

Abstract: SPL transcription factors are widely involved in plant growth and development, stress response and so on. At present, there is no study on the the STM (SPL with transmembrane motif) transcription factor in *D. officinale*.. In order to explore the role of STM in the growth, development and stress response of *D. officinale*, four STM transcription factors were identified at the whole genome of *D. officinale*, and the members of *DoSTM* gene family were bioinformatics analyzed. The expression of *DoSTM* in different tissue parts and different stress treatments were studied by reverse transcription PCR. The results were as follows: (1)DoSTM1-4 were hydrophilic proteins with SBP conserved domains and some hormone response sites. (2)Four *DoSTM* were expressed in roots, stems and leaves, and the relative expression of *DoSTM*2 was the lowest in leaves; There was no significant differences in the relative expression level of *DoSTM*1/3/4. (3)The relative expression level of *DoSTM*1-4 changed significantly under low temperature, high temperature and drought stress, and the expression of *DoSTM*1/3/4 decreased most significantly. Therefore, it is speculated that DoSTM is related to hormone response, temperature change response and drought resistance in plants. These conclusions lay a foundation for further research on STM transcription factor of *D. officinale*.

Key word: *Dendrobium officinale*, STM transcription factor, gene identification, functional

基金项目：国家自然科学基金(31900164)；中央高校基本科研业务费(2682021CX121)；西南交大个性化实验项目(GX2021160027)[Supported by National Natural Science Foundation of China (31900164); Basic Scientific Research Business Fee of Central Universities (2682021CX121); Personalized Experimental Project of Southwest Jiaotong University (GX2021160027)]。

作者简介：杨乐(1997-)，硕士，主要从事植物生长发育与次生代谢研究，(E-mail)2295402195@qq.com。

***通信作者:**王万军，博士，教授，植物生长发育与次生代谢，(E-mail) wanjunwang@home.swjtu.edu.cn。

analysis, gene expression

石斛主要分布在东南亚和大洋洲的热带及亚热带地区，喜生长在温暖潮湿的环境中，附着在树干或岩石上 (罗凯等，2021)。铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)为兰科石斛属多年生草本植物，具有极高药用价值，是一种药食两用中药材，其成分主要包括多糖类、生物碱类、黄酮类以及酚酸类等，在抗肿瘤和增强免疫力等方面具有功效 (唐文文等，2021)。近年来由于过度挖采导致野生资源大量降低，故从分子水平研究铁皮石斛的生长发育对其保育有重要意义 (曾丹琦等，2021)。

SPL(Squamousa promoter binding protein like)基因家族作为植物特有的一类转录因子，主要通过结合下游基因启动子区的顺式作用元件来调控下游基因表达。SPL 转录因子在植物的生长发育、信号传导、胁迫响应等方面有着重要的作用 (吴艳等，2019)。这类转录因子最早在金鱼草中被发现。随后，发现了更多 SPL 转录因子在植物生长发育以及在胁迫响应中起着重要作用 (Yu et al., 2015; Xu et al., 2016)。在甘蓝型油菜的愈伤组织、根、茎、叶、芽、花和角果中有大量 *BoSPL* 表达，并且这些基因可能在甘蓝耐寒性中起重要作用 (Shan et al., 2021)。据最近报道，拟南芥 *SPLs* 可能参与其从幼年到成年的营养转化、生殖期的形态变化、花青素生物合成和防御胁迫 (Jiang et al., 2021)。其中，*SPL3* 在花序和花器官的发育中发挥重要作用 (Gandikota et al., 2007)，在各种低磷胁迫反应以及低磷条件下磷饥饿诱导基因表达中都有 *SPL*1 的参与介导 (雷凯健等，2016)。

转录因子的研究是植物分子生物学的重要内容，在植物抗逆等方面起重要作用。转录因子和基因顺式作用元件的相互作用激活了相关抗逆基因的表达，提高了植物的抗逆性。有一类特殊的转录因子存在，因其含有一段跨膜区被称为膜结合转录因子，可直接整合在细胞内的膜结构上 (如细胞质膜、内质网膜、核膜等)，一般处于休眠状态，当受到外界环境变化刺激后，膜结合转录因子便从膜上释放，转变为激活状态，并转运到细胞核内行使功能 (王楠等，2016)。SPL 转录因子中也有这类膜结合转录因子，且目前并没有专门研究 SPL 膜结合转录因子的报道，因此，本研究通过 BLASTP 在铁皮石斛全基因组鉴定出 4 个 SPL 膜结合转录因子，命名为 DoSTM (SPL with transmembrane motif)转录因子，并进行后续生物信息学及表达分析。

1 材料与方法

1.1 材料

将铁皮石斛幼苗分别置于 1/2MS 培养基、含 100 mmol·L^{-1} NaCl 的 1/2MS 液体培养基、含 5 μmol·L^{-1} 脱落酸的 1/2MS 液体培养基、质量分数为 10% PEG 的 1/2MS 液体培养基 40 ℃ 1/2MS 液体培养基、4 ℃ 1/2MS 液体培养基中处理 6 h，吸干水分后将幼苗按 200~300 mg 装入 1.5 mL 离心管中，并做好标记，迅速置于液氮中 1 min，取出放入-80 ℃ 冰箱保存待用；以盆栽铁皮石斛幼嫩的根茎叶组织作为原材料，进行根茎叶差异表达分析。

1.2 试剂

RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒（北京擎科）、琼脂糖（北京擎科）、2×TSINGKE Master Mix（北京擎科）、RNA 无酶水（北京擎科）、PrimeScriptTM II 1st Strand cDNASynthesis Kit 试剂盒（宝生物）、50×TAE（上海生工）。

1.3 方法

1.3.1 铁皮石斛 STM 蛋白的理化性质及亚细胞定位分析

从 NCBI 数据库中下载拟南芥 STM 蛋白序列，将物种限定在铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)并进行 BLAST 搜索，下载搜索到的铁皮石斛的 STM 蛋白序列，去除冗余序列，

利用 TMHMM(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)预测跨膜结构域，最终选取 XP_020685848、XP_020681923、XP_020672795、XP_020688542 这四个蛋白进行研究，并分别命名为 DoSTM1、DoSTM2、DoSTM3、DoSTM4。利用 ProtParam(https://web.expasy.org/protparam/)分析铁皮石斛 STM 蛋白家族的理化性质。用 Plant-mPLoc(http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant/) (Chou & Shen, 2007)对 DoSTM 蛋白家族进行亚细胞定位分析。

1.3.2 铁皮石斛 STM 家族的系统进化树分析

从 NCBI 数据库中下载野蕉 (*Musa balbisiana*)、铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、蝴蝶兰 (*Phalaenopsis equestris*)、毛白杨 (*Populus tomentosa*)、扇形文心兰 (*Erycina pusilla*)、玉米 (*Zea mays*)、水稻 (*Oryza sativa*)、生姜 (*Zingiber officinale*)的 STM 蛋白序列 Fasta 格式。用 MEGA-X 邻近法构建进化树，序列比对采用 ClustalW，选择 Bootstrap method，Bootstrap replications 选择 500，Model 选择 p-distance，Gaps/Missing Data Treatment 选择 Partial deletion，Site Coverage Cutoff 设定为 50，进行建树。建树结果在 ITOL(https://itol.embl.de/)中进行美化。

1.3.3 铁皮石斛 STM 蛋白质二级结构预测

在 SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)在线网站对铁皮石斛 STM 蛋白质的二级结构进行分析，参数默认。

1.3.4 铁皮石斛 STM 蛋白质序列比对及保守基序分析

将 4 个 DoSTM 蛋白导入 MEME (Bailey & Elkan et al., 1994)在线网站(https://meme-suite.org/meme/tools/meme)进行分析，将 motifs 的数量设定在 10，其他参数默认，进行分析。将铁皮石斛 STM 蛋白序列 fasta 格式导入 MEGA-X 中进行构树，序列比对采用 ClustalW，选择 Bootstrap method，Bootstrap replications 选择 500，Model 选择 p-distance，Gaps/Missing Data Treatment 选择 Partial deletion，Site Coverage Cutoff 设定为 50，进行构树。从 NCBI 数据库中下载铁皮石斛 STM 蛋白的 CDD，利用 TBtools (Chen et al., 2020)对 DoSTM 保守基序、保守结构域、进化树进行绘图。将铁皮石斛 STM 蛋白的 ClustalW 比对结果导入 ESPript3.0 在线网站(https://espript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi)进行分析。

1.3.5 铁皮石斛 STM 基因结构及顺式作用元件分析

从 NCBI 数据库中下载铁皮石斛的基因组信息，在 TBtools 进行基因结构绘制，同时获得启动子上游 2 000 bp 的序列信息，获得的序列信息由 PlantCARE (Lescot et al., 2002)网站(http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)进行顺式作用元件预测，并用 TBtools 进行绘图。

1.3.6 引物设计

利用 4 个 *DoSTM* 的 cDNA 序列，将所得的 cDNA 序列用 Primer-BLAST 进行引物设计，引物大小设定为 18~22 bp，PCR 产物大小设定为 400~800 bp，其他参数均为默认参数，在输出的引物中选择靠近 3’端的作为试验所用引物，选用 *EF1-α* 做内参，相应的引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence
DoSTM1	F：GTCTATCAGCGTCTCCTGCC
	R：CGCGCATAGTCTTCAGGAGT
DoSTM2	F：CTTTCTGATGCAATCGGGCG

	R：ATAAGGCATGTTGACGGCCA
DoSTM3	F：TGAGCCGAGCAGTGAAGAAG
	R：GGAGCACCTCGGAAGAACAA
DoSTM4	F：AGCAGTGATTGTGGGCATGA
	R：ATGCAAGTGCAGGAAGCTCA
EF1-α	F：CCACCACCCCCAAATACTCC
	R：TCCCTAACAGCGAAACGTCC

1.3.7 铁皮石斛 STM 基因表达分析

将铁皮石斛幼苗分别置于 1/2MS 液体培养基、含 100 mmol·L^{-1} NaCl 的 1/2MS 液体培养基、含 5 μmol·L^{-1} ABA 的 1/2MS 液体培养基、含 10%PEG 的 1/2MS 液体培养基、40 ℃ 1/2MS 液体培养基、4 ℃ 1/2MS 液体培养基中处理 6 h，迅速置于液氮中 1 min，取出放入-80 ℃冰箱保存待用。用 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取 6 种处理的铁皮石斛幼苗的 RNA 和铁皮石斛幼苗根茎叶的 RNA，并用 PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 进行 cDNA 第一链的合成。再以 cDNA 第一链为模板，2×TSINGKE Master Mix 及引物进行 PCR 扩增。PCR 反应程序：98 ℃预变性 2 min；98 ℃变性 15 s，55 ℃退火 15s，72 ℃延伸 1min，变性−退火−延伸 30 个循环；72 ℃继续延伸 10 min。最后进行 1%凝胶电泳，拍照记录电泳条带。

1.3.8 数据处理及分析

用 ImageJ 测定电泳条带的灰度值，Excel 对所得灰度值进行处理，将处理后的数据导入 GraphPad prism5 中进行分析及作图，分析方法选用 Students *t* test，显著水平均设为 0.05。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛 STM 蛋白家族理化性质及亚细胞定位分析

将筛选到的铁皮石斛 STM 蛋白 DoSTM1-4 进行跨膜结构域预测 (图 1)，结果显示跨膜结构域位于 C 末端 22 个氨基酸残基处。DoSTM 蛋白家族的理化性质分析结果 (表 2)表明 DoSTM1-4 的氨基酸数目分别为 1 025、977、1 104、830，相对分子质量分别为 113.53、109.09、121.67、93.177；等电点 pI 在 6.07~8.06 之间；不稳定系数在 44.37~58.41 之间，较为不稳定；脂肪系数在 78.15~83.04 之间；总平均亲水系数均为负数，在-0.405~-0.335 之间，表明 DoSTM 蛋白均为亲水蛋白质。亚细胞定位预测结果显示 DoSTM1-3 定位在细胞核，DoSTM4 定位在叶绿体。

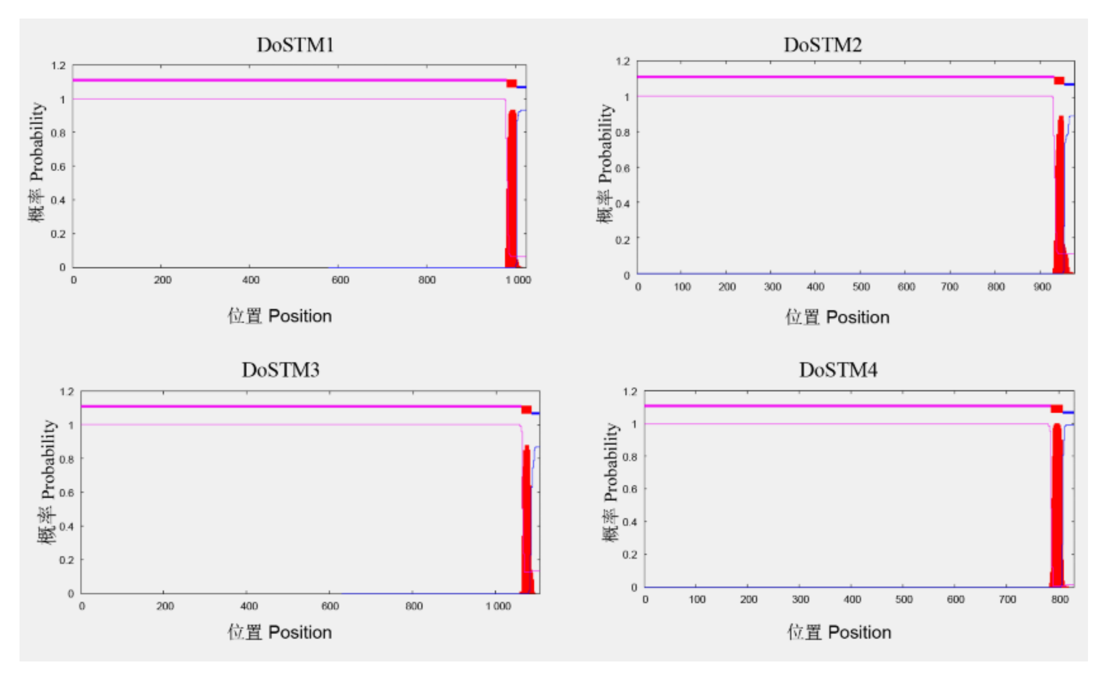


图 1 DoSTM 蛋白跨膜结构预测

Fig.1 DoSTM protein transmembrane structure prediction

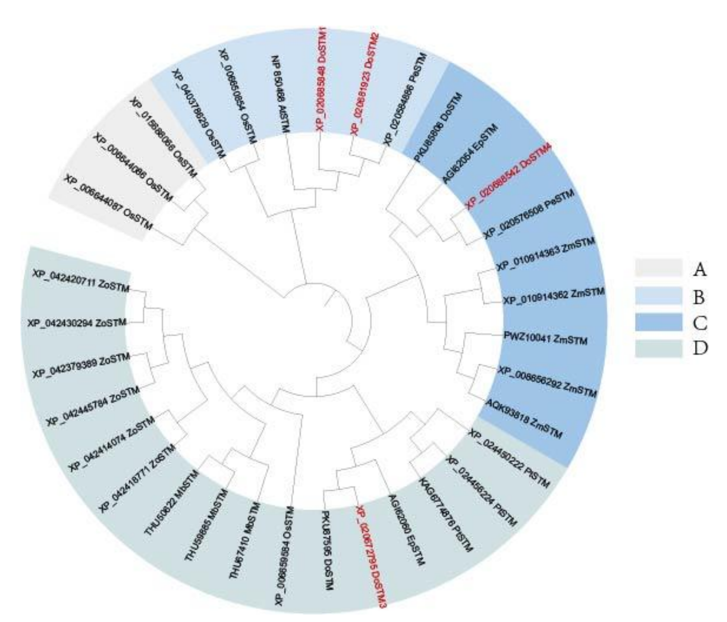
表 2 DoSTM 蛋白家族理化性质

Table 2 Physical and chemical properties of DoSTM protein family

基因符号 Gene symbol	基因名称 Gene name	蛋白 ID Protein ID	氨基酸大小 Amino acid size (aa)	分子量 Molecular weight (kDa)	等电点 pI	不稳定系数 Instability index	脂肪系数 Fat coefficient	总平均亲水系数 GRAVY
LOC110102024	*DoSTM*1	XP_020685848	1 025	113.53	6.79	55.34	80.40	-0.347
LOC110099183	*DoSTM*2	XP_020681923	977	109.09	8.06	50.08	82.72	-0.335
LOC110092545	*DoSTM*3	XP_020672795	1 104	121.67	6.64	58.41	78.15	-0.405
LOC110103975	*DoSTM*4	XP_020688542	830	93.177	6.07	44.37	83.04	-0.280

2.2 铁皮石斛 STM 基因家族的系统进化分析

系统进化分析（图 2）显示，9 个物种的 34 个 STM 蛋白聚为 4 组 (A-D)，A 组的 STM 蛋白共有 3 个，B 组的 STM 蛋白共有 6 个，C 组的 STM 蛋白共有 9 个，D 组的 STM 蛋白共有 16 个。其中，DoSTM1-2 蛋白共同聚类在 B 组，有可能是较近发生的基因复制事件所造成；DoSTM4 聚类在 C 组；DoSTM3 蛋白聚类在 D 组。



Mb. 野蕉；**Do**. 铁皮石斛；**At**. 拟南芥；**Pe**. 蝴蝶兰；**Pt**. 毛白杨；**Eg**. 油棕；**Ep**. 扇形文心兰；**Zm**. 玉米；**Os**. 水稻；**Zo**. 生姜。

Mb. *Musa balbisiana*; **Do**. *Dendrobium officinale*; **At**. *Arabidopsis thaliana*; **Pe**. *Phalaenopsis equestris*; **Pt**. *Populus tomentosa*; **Eg**. *Elaeis guineensis*; **Ep**. *Erysina pusilla*; **Zm**. *Zea mays*; **Os**. *Oryza sativa*; **Zo**. *Zingiber officinale*.

图 2 9 种植物 STM 蛋白进化关系

Fig.2 Evolutionary relationship of STM proteins in nine plants

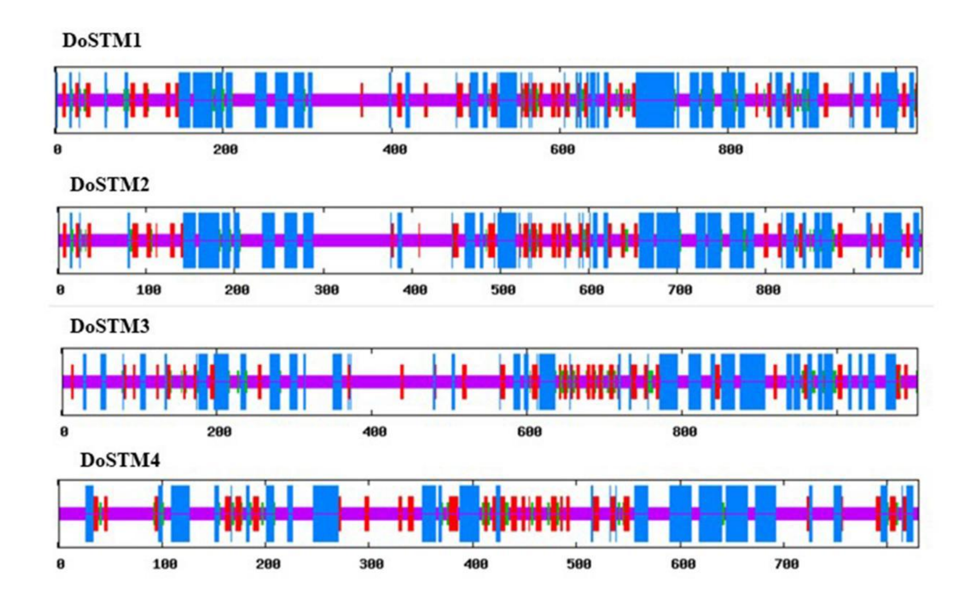
2.3 铁皮石斛 STM 蛋白的二级结构

对 DoSTM 蛋白质的二级结构进行分析，二级结构占比如表 3 所示，二级结构图如图 3 所示。结果表明，铁皮石斛 STM 蛋白的二级结构包括 α 螺旋、伸展链、β 转角和无规卷曲，其中，铁皮石斛 STM 蛋白的 α 螺旋占比为 28.62%~33.76%，伸展链占比为 11.68%~14.70%，β 转角占比为 4.09%~4.78%，无规卷曲占比为 49.56%~55.34%。

表 3 铁皮石斛 STM 蛋白的二级结构占比

Table 3 Proportion of secondary structure of *Dendrobium officinale* STM protein

基因名称 Gene name	α 螺旋 α-helix (%)	伸展链 Extended strand (%)	β 转角 β-angle (%)	无规卷曲 Random coil (%)
*DoSTM*1	33.76	11.90	4.78	49.56
*DoSTM*2	33.06	12.08	4.09	50.77
*DoSTM*3	28.62	11.68	4.53	55.34
*DoSTM*4	29.52	14.70	4.58	51.20



蓝色代表 α 螺旋，红色代表伸展链，绿色代表 β 转角，紫色代表无规卷曲。

Blue represents α-helix, red represents extended strand, green represents β-angel, and purple represents random coil.

图 3 SOPMA 预测的 DoSTM 蛋白二级结构

Fig.3 Secondary structure of DoSTM protein predicted by SOPMA

2.4 铁皮石斛 STM 家族蛋白结构分析

对 4 个 DoSTM 蛋白进行多序列比对 (图 4)，结果显示 DoSTM1/2 蛋白序列同源性较高。DoSTM 蛋白的保守基序分析结果表明 4 个 DoSTM 蛋白均有 SBP 保守结构域，而 DoSTM1/3 还同时包含 Ank_2 superfamily，DoSTM2 则另外包含 ANKYR (图 5)。同源的 DoSTM1 与 DoSTM2 含有 motif 1-10，而 DoSTM3 与其相比缺少 motif 7/10，DoSTM4 不仅缺少 motif 7/10，还缺少 motif 3/4 (图 5)。表明 4 个 DoSTM 的蛋白结构并不高度保守。

图 4 DoSTM 蛋白的多重序列比对

Fig.4 Multiple sequence alignment of DoSTM protein

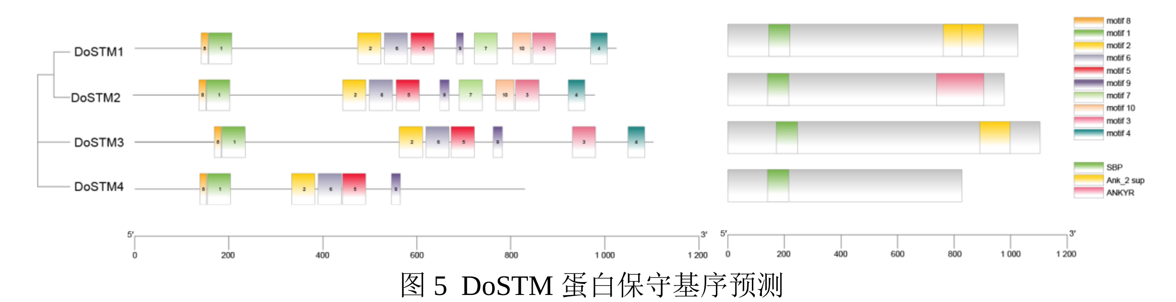
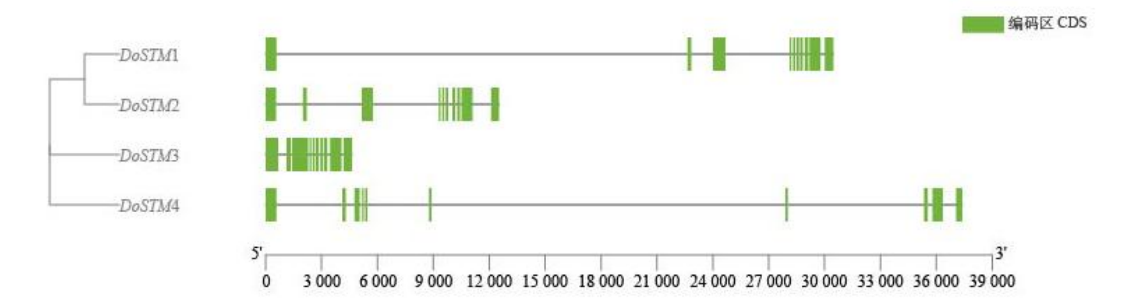


图 5 DoSTM 蛋白保守基序预测

Fig.5 Conserved motif prediction of DoSTM protein

2.5 铁皮石斛 STM 基因结构及顺式作用元件分析

DoSTM 基因结构分析如图 6 所示，发现 4 个 *DoSTM* 均有 10 个编码区(由于 gff3 未注释 UTR，故未标识非编码区)。顺式作用元件分析（图 7）发现 4 个 *DoSTM* 中均有光响应区和光响应元件，其中 *DoSTM*1/2/3 共同包含茉莉酸甲酯响应区，而防御应急响应只在 *DoSTM*2/4 中具备，除此之外 *DoSTM*4 还含有生长素响应元件。而 *DoSTM*1 则可以对脱落酸作出响应，*DoSTM*3 作为包含顺式作用元件最多的 STM 蛋白，它还可以对赤霉素、水杨酸、生长素及低温作出响应。



CDS 表示编码区，黑线表示内含子。

CDS represents coding region and black line represents intron.

图 6 *DoSTM* 基因结构

Fig.6 *DoSTM* gene structure

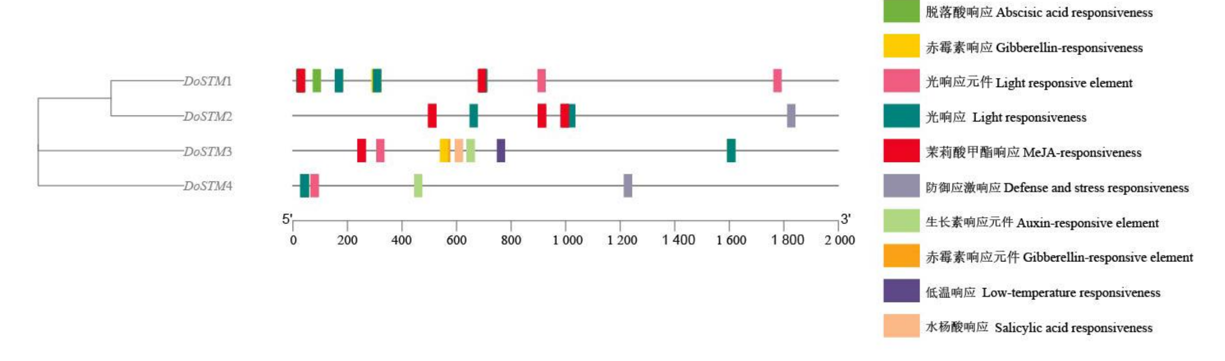


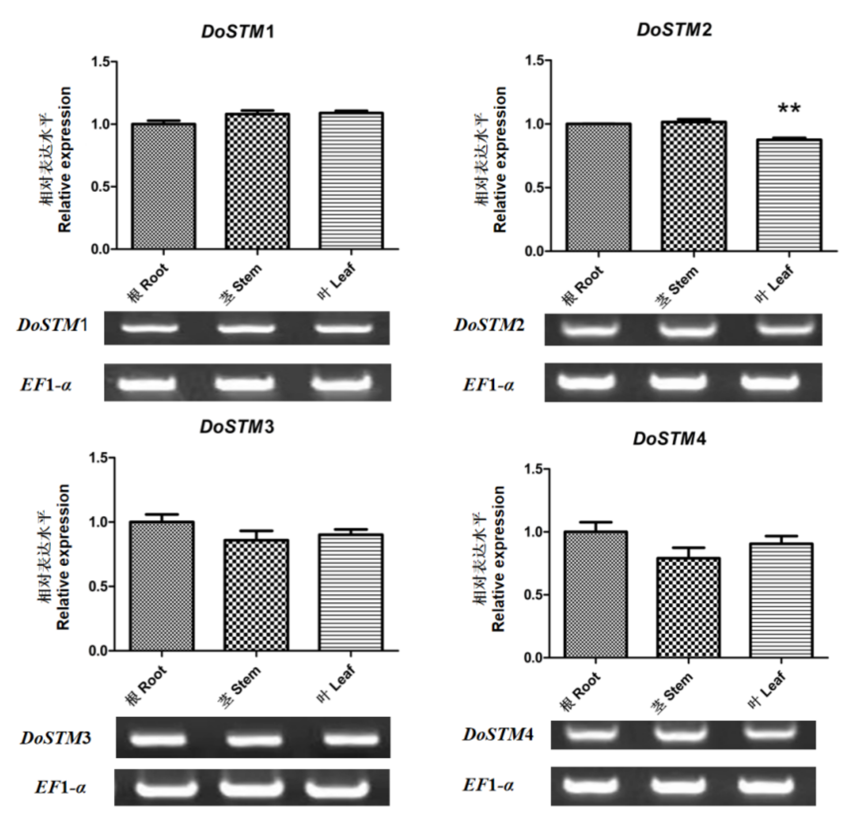
图 7 *DoSTM* 顺式作用元件分析

Fig.7 Analysis of *cis*-acting elements of *DoSTM*

2.6 铁皮石斛 STM 的表达分析

2.6.1 铁皮石斛 STM 在根茎叶中的表达情况

我们对 *DoSTM* 在根茎叶三个不同器官的相对表达水平进行了分析 (图 8)。我们发现，*DoSTM* 在根茎叶中均有表达，*DoSTM*2 在叶中的相对表达量显著降低，而在茎中的表达水平则无明显差异；*DoSTM*1/3/4 的相对表达水平均无明显差异，*DoSTM*1 在茎和叶中的表达量相差无几，但略高于根，而 *DoSTM*3/4 则是在叶中的相对表达水平高于茎，且都低于根。



*EF*1-*α* 为内参。**表示 *P*<0.01，*n*=3。

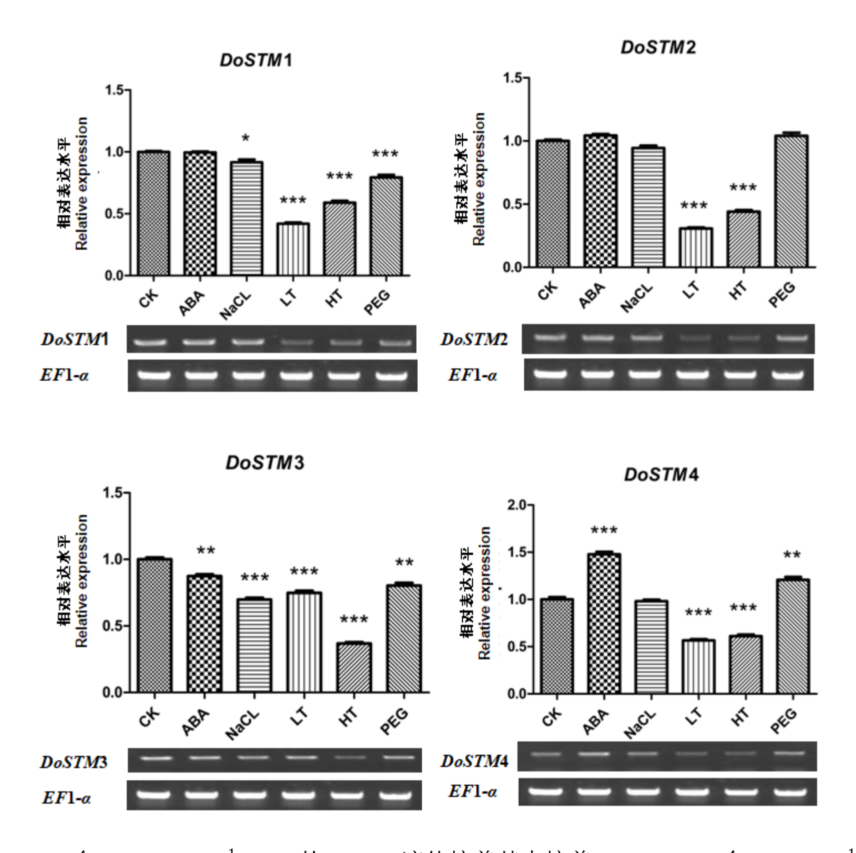
*EF*1-*α* is an internal reference. ** indicates *P*<0.01, *n*=3.

图 8 *DoSTM* 在根茎叶中的相对表达水平

Fig. 8 Relative expression levels of *DoSTM* in root, stem and leaf

2.6.2 铁皮石斛 STM 在胁迫处理下的表达情况

铁皮石斛多生长在悬崖峭壁，会受到多种非生物胁迫，STM 转录因子也有报道参与多种抗逆反应 （王楠等，2016），故本研究进一步分析了 *DoSTM* 在不同胁迫条件下的表达情况 (图 9)。结果表明，*DoSTM*1 在 4 ℃低温、40 ℃高温和 10% PEG 胁迫处理下的相对表达水平低于对照组，而在 ABA 胁迫处理下的相对表达水平无显著差异，但 NaCl 胁迫处理下，表达量略有降低；而 *DoSTM*2 在 4 ℃低温和 40 ℃高温胁迫处理下的相对表达水平与对照组相比显著降低，在 ABA、NaCl、10%PEG 胁迫处理下无明显差异；*DoSTM*3 在 NaCl、4 ℃低温和 40 ℃高温胁迫处理下的相对表达水平与对照组相比显著降低，在 ABA 和 10%PEG 胁迫处理下与对照组相比稍有差异；与 *DoSTM*3 相似的是，*DoSTM*4 在 4 ℃低温和 40 ℃高温胁迫处理下有显著变化，在 ABA 胁迫处理下也发生显著变化，但在 NaCl 胁迫处理下无明显差异。



CK. 对照；**NaCl**. 含 100 mmol·L^{-1} NaCl 的 1/2MS 液体培养基中培养 6 h；**ABA**. 含 5 μmol·L^{-1} 的 ABA 的 1/2MS 液体培养基中培养 6 h；**PEG**. 含 10% PEG 的 1/2MS 液体培养基中培养 6 h；**HT**. 40 ℃ 1/2MS 液体培养基中培养 6 h；**LT**. 4 ℃ 1/2MS 液体培养基中培养 6 h；*EF*1-*α* 为内参。*表示 P<0.05，**表示 P<0.01，***表示 P<0.001，n=3.。

CK. Control; **NaCl**. Cultured in 1/2MS liquid medium containing 100 mmol·L NaCl for 6 h; **ABA**. Cultured in 1/2MS liquid medium containing 5 μmol·L ABA for 6 h; **PEG**. 1/2MS liquid medium containing10% PEG cultured in medium for 6 h; **HT**. Cultivated in 40 ℃ 1/2MS liquid medium for 6 h; **LT**. Cultivated in 4 ℃ 1/2MS liquid medium for 6 h; *EF*1-*α* is an internal reference. * indicates P<0.05, ** indicates P<0.01, *** indicates P<0.001, n=3.

图 9 *DoSTM* 在胁迫处理 6 h 下的相对表达水平

Fig.9 Relative expression levels of *DoSTM* under stress treatments for 6 h

3 讨论与结论

本研究从铁皮石斛基因组上鉴定出 4 个 STM 蛋白序列，对 4 个 STM 编码的蛋白进行生物信息学分析。结果表明，4 个 DoSTM 蛋白均为亲水蛋白质；DoSTM1/3/4 的等电点均小于 7，DoSTM2 则大于 7，这一点与大部分 STM 蛋白家族成员的理论等电点大于 7 有出入（张晓红等，2016；刘闯等，2017；祁香宁等，2018）。*SPL* 基因家族蛋白含有 1 个高度保守的 SBP-BOX 结构域，是 SPL 蛋白和 DNA 分子特异性结合所必需的，与我们在保守结构域预测时的发现一致。

李豆等 (2021)将白桦 *BpSPL6* 基因启动子驱动 GUS 基因在转基因拟南芥营养生长期的根尖及根的其他部位表达，发现在营养生长时期其在根部的表达也随植物的生长逐渐增加，与前人研究一致，故他推测 *BpSPL6* 基因可能在植物的根发育过程中起作用。这与我们测得 *DoSTM*2/3/4 在根中的相对表达水平略高一致，推测 *DoSTM* 可能参与根的发育。

激素参与了植物生长发育的各个方面，已有多项研究表明 *SPL* 基因参与植物的激素响应过程。在白桦 *BpSPL6* 基因启动子的顺式作用元件分析表明 (李豆等，2021)，其启动子区

含有 10 种激素响应元件 (生长素、赤霉素、水杨酸、脱落酸等)。这与我们得到的 *DoSTM* 顺式作用元件分析结果类似，并且与在 ABA 胁迫条件下 *DoSTM*3/4 的相对表达水平发生显著变化一致。RNA-seq 研究发现拟南芥 *SPL*10 对茉莉酸、水杨酸和生长素等激素响应过程有广泛影响。*AtSPL*10 通过调节生长素的生物合成抑制根的再生 (Ye et al., 2020)。赤霉素通过调节茎分生组织中的 *AtSPL*3/4/5 基因促进开花 (Galvão et al., 2012)。在 *DoSTM* 启动子上也发现了多种激素响应元件，故推测 *DoSTM* 可能参与多种激素响应。

大量研究表明 *SPL* 基因能够响应低/高温等非生物胁迫的信号。如 Stief 等 （2014）发现在高温条件下，*SPL*2/9/11 基因被 *miR*156-*f* 和 *miR*156-*h* 调控使其表达降低，进而延长植物对高温胁迫的耐受性。除高温条件外，葡萄对低温条件也较敏感，在低温条件下 (5 ℃)，体内的 *VvSBP*3 和 *VvSBP*5 表达均被上调，而 *VvSBP*4 和 *VvSBP*7 表达明显被下调，表明 *VvSBP*3 和 *VvSBP*5 参与葡萄的低温胁迫反应 (吴艳等，2019)。这与 *DoSTM*1-4 在低/高温胁迫条件下的相对表达量发生显著变化一致。

对白桦 *BpSPL*6 转基因拟南芥进行了 NaCl 和 PEG 胁迫实验 (李豆等，2021)，发现受到胁迫后，其表达量有下降，与我们观测到的在 PEG 胁迫条件下，*DoSTM* 的相对表达水平显著下调一致，推测 *DoSTM* 很可能参与植物的干旱胁迫响应。崔扬等 (2019)发现玉米遭受干旱胁迫时，*ZmSPL*16 在根中的表达量显著上调，这与 *DoSTM*4 结果一致，但与 *DoSTM*1/3 不一致，具体原因有待进一步研究。

本文在铁皮石斛全基因组水平鉴定出 4 个 STM，生物信息学分析显示他们均为亲水蛋白，大部分定位在细胞核，都具有高度保守的 SBP 结构域以及与激素响应有关的顺式作用元件。表达分析显示他们在根中的表达量略高于茎和叶，胁迫分析显示其在低温、高温及干旱胁迫下相对表达水平显著变化，且部分 *DoSTM* 可以对脱落酸作出响应。以上研究结果为进一步研究 DoSTM 转录因子的生物学功能奠定了基础。

参考文献：

BAILEY TL, ELKAN C, 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers[J]. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol: 28-36.

CHOU KC, SHEN HB, 2007. Large-scale plant protein subcellular location prediction[J]. J Cell Biochem, 100(3): 665-78.

CHEN CG, CHEN H, ZHANG Y, et al., 2020. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Mol Plant, 13(8): 1194-1202.

CUI Y, FENG YH, CHEN ZF, et al., 2019. Cloning and functional identification of maize transcription factor ZmSPL16[J]. Mol Plant Breed, 17(20): 6583-6589. [崔扬，冯彦辉，陈众峰，等，2019. 玉米转录因子 ZmSPL16 的克隆与功能鉴定[J]. 分子植物育种，17(20)：6583-6589.]

GALVÃO VC, HORRER D, KÜTTNER F, et al., 2012. Spatial control of flowering by DELLA proteins in *Arabidopsis thaliana*[J]. Development, 139(21): 4072−4082.

GANDIKOTA M, BIRKENBIHL RP, HOHMANN S, et al., 2007. The miRNA156/157 recognition element in the 3′UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings[J]. Plant J, 49(4): 683-693.

JIANG XW, CHEN P, ZHANG XW, et al., 2021. Comparative analysis of the SPL gene family in five Rosaceae species: *Fragaria vesca*, *Malus domestica*, *Prunus persica*, *Rubusoccidentalis*, and *Pyrus pyrifolia*[J]. Open Life Sci, 16(1): 160-171.

LUO K, LI ZS, BAI YB, et al., 2021. Current situation of diversity utilization and protection of *Dendrobium*[J]. Heilongjiang Agric Sci, (8): 85-89.[罗凯，李泽生，白燕冰，等，2021. 石斛兰多样性利用及保护现状[J]. 黑龙江农业科学，(8)：85-89.]
LEI KJ, REN J, ZHU YY, et al., 2016. Arabidopsis *SPL*1 gene is involved in regulating rhizosphere acidification under low phosphorus conditions[J]. Acta Bot Sin, 51(2): 184-193.[雷凯健，任晶，朱园园，等，2016. 拟南芥 *SPL*1 基因参与调节低磷条件下的根际酸化反应[J]. 植物学报，51(2)：184-193.]
LESCOT M, DEHAIS P, THIJS G, et al., 2002. Plant CARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences[J]. Nucl Acids Res, 30(1): 325-7.
LI D, SU GB, HU XQ, et al., 2021. Cloning and expression analysis of *BpSPL*6 gene promoter of *Betula platyphylla*[J]. J Beijing For Univ. https://kns.cnki.net/kcms/detail/ 11.1932.S.20210610.0948.001.html.[李豆，苏功博，胡晓晴，等，2021. 白桦 *BpSPL*6 基因启动子的克隆及表达分析[J]. 北京林业大学学报，https://kns.cnki.net/kcms/detail/ 11.1932.S.20210610.0948.001.html.]
LIU C, 2017. Identification of 18 *Betula platyphylla SPLs* genes and functional analysis of *BpSPL*8 gene[D]. Harbin: Northeast Forestry University.[刘闯，2017. 18 个白桦 *SPLs* 基因的鉴定及 *BpSPL*8 基因的功能分析[D]. 哈尔滨：东北林业大学.]
QI XN, 2018. Identification, evolution and expression analysis of *Actinidia sinensis* SBP-box transcription factor gene[D]. Yangling: Northwest A & F University.[祁香宁，2018. 猕猴桃 SBP-box 转录因子基因的鉴定、进化及其表达分析[D]. 杨凌：西北农林科技大学.]
SHAN X, ZHANG W, HUANG JX, et al., 2021. Identification and characterization of SPL transcription factor family reveals organization and chilling-responsive patterns in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)[J]. Agronomy, 11(7): 1445-1445.
STIEF A, ALTMANN S, HOFFMANN K, et al., 2014. Arabidopsis miR156 regulates tolerance to recurring environmental stress through SPL transcription factors[J]. Plant Cell, 26(4): 1792-1807.
TANG WW, XIA JL, CHEN Y, 2021. Functional components, antioxidant activity and correlation of stem, leaf and flower of *Dendrobium officinale*[J]. Food Mach, 37(7): 45-50.[唐文文，夏俊丽，陈垣，2021. 铁皮石斛茎、叶、花功能性成分、抗氧化活性及其相关性[J]. 食品与机械，37(7)：45-50.]
WANG N, XIANG FN, LI S, 2016. Advance in plant membrane-bound transcription factors and stress response[J]. Chin Bull Life Sci, 28(7): 799-806.[王楠，向凤宁，李朔，2016. 植物膜结合转录因子与胁迫响应[J]. 生命科学，28(7)：799-806.]
WU Y, HOU ZH, CHENG Q, et al., 2019. Research progress of SPL transcription factors[J]. Soybean Sci, 38(2): 304-310.[吴艳，侯智红，程群，等，2019. SPL 转录因子的研究进展[J]. 大豆科学，38(2)：304-310.]
XU ML, HU TQ, ZHAO JF, et al., 2016. Developmental functions of miR156-regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) genes in *Arabidopsis thaliana*[J]. PLoS Genet, 12(8): e1006263.
YE BB, SHANG GD, PAN Y, et al., 2020. AP2/ERF transcription factors integrate age and wound signals for root regeneration[J]. Plant Cell, 32(1): 226−241.
YU ZX, WANG LJ, ZHAO B, et al., 2015. Progressive regulation of sesquiterpene biosynthesis in *Arabidopsis* and patchouli (*Pogostemon cablin*) by the miR156-targeted SPL transcription factors[J]. Mol Plant, 8(1): 98-110.

YANG ZT, XIONG ML, JIAN Y, et al., 2018. Research progress on the activation mechanism of membrane-bound transcription factors in endoplasmic reticulum stress[J]. Mol Plant Breed, 16(24): 8028-8033.[杨正婷，熊孟连，简燕，等，内质网应激中膜结合转录因子的活化机制研究进展[J]. 分子植物育种，16(24)：8028-8033.]

ZENG DQ, ZHANG MZ, HE CM, et al., 2021. Identification and analysis of WOX transcription factors in *Dendrobium officinale*[J]. J Trop Subtrop Plants, 29(3): 301-310.[曾丹琦，张明泽，何春梅，等，2021. 铁皮石斛 WOX 转录因子的鉴定和分析[J]. 热带亚热带植物学报，29(3)：301-310.]

ZHANG XH, 2016. Functional study and regulatory analysis of flowering related genes in upland cotton[D]. Yangling: Northwest A & F University. [张晓红，2016. 陆地棉开花相关基因的功能研究及调控分析[D]. 杨凌：西北农林科技大学.]